

Aus der 1. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. J. Zander

EINBAU VON 125 J-FIBRINOGEN
IN ZIRKULIERENDE LÖSLICHE
FIBRINMONOMER KOMPLEXE
WÄHREND DER HYPERKOAGULABILITÄT

Eine tierexperimentelle Untersuchung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
BETTINA STEIN
aus Bremen
1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551903_0062

Aus der 1. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. J. Zander

EINBAU VON 125 J-FIBRINOGEN
IN ZIRKULIERENDE LÖSLICHE
FIBRINMONOMER KOMPLEXE
WÄHREND DER HYPERKOAGULABILITÄT

Eine tierexperimentelle Untersuchung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
BETTINA STEIN
aus Bremen
1980



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Graëff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Zander

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.1980

1.	Einleitung	1
2.	Themenstellung und Aufgabenstellung	2
3.	Methoden und Vorgehensweise	3
4.	Ergebnisse	4
5.	Fazit und Zusammenfassung	5
6.	Literaturverzeichnis	6
7.	MEINEN ELTERN	7
8.	Einleitung	8
9.	Themenstellung und Aufgabenstellung	9
10.	Methoden und Vorgehensweise	10
11.	Ergebnisse	11
12.	Fazit und Zusammenfassung	12
13.	Literaturverzeichnis	13
14.	MEINEN ELTERN	14
15.	Einleitung	15
16.	Themenstellung und Aufgabenstellung	16
17.	Methoden und Vorgehensweise	17
18.	Ergebnisse	18
19.	Fazit und Zusammenfassung	19
20.	Literaturverzeichnis	20

I N H A L T

A	Einleitung	1
B	Konzeption des Versuchs	6
C	Material und Methoden	8
	1. Fibrinogen	8
	2. Tiere und Versuchsaufbau	9
	3. Plasmaaufbereitung	10
	4. Anreicherung von Fibrinogen und seinen Derivaten durch Fällung mit β -Alanin	10
	5. Agarose-Gelfiltration	10
	6. Berechnung des relativen Gehaltes an LFMK im Plasma	11
	7. Affinitätschromatographie	13
	8. Statistische Methoden	14
D	Ergebnisse	15
	1. Relativer LFMK-Gehalt	15
	2. 125 J-Fibrinogen in den LFMK-Fractionen	15
	3. Ergebnisse der Affinitätschromatographie	16
E	Diskussion	18
F	Zusammenfassung	29
G	Literaturverzeichnis	30

A Einleitung

Die Aufgabe des Gerinnungssystems liegt in der Bildung eines unlöslichen Fibrinnetzes, das zusammen mit einem Aggregat aus Thrombozyten das verletzte Gefäß verschließt.

Die Fibrinbildung erfolgt in einer dreiphasigen Reaktionskette, an deren Ende die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin steht.

Fibrinogen ist ein Protein und hat ein Molekulargewicht von ca. 340 000 Daltons. Es setzt sich aus 2 symmetrischen Untereinheiten zusammen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Untereinheit besteht aus drei Proteinketten: α , β und γ , die ebenfalls durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind (Bachmann et al. 1975, Blombäck u. Blombäck 1977). Das Fibrinogenmolekül kann mit folgender Formel beschrieben werden: $2 (\alpha, \beta, \gamma)$ (Latallo 1973). Die Peptidketten besitzen eine Antigeneigenschaft, so daß sie durch ihre Antikörper immunologisch als Fibrinogenbestandteile zu identifizieren sind (Gerrits et al. 1974).

Unter der proteolytischen Wirkung des Thrombins werden vom NH_2 -Ende der α - und der β -Ketten je ein Peptid (Fibrinopeptide A bzw. B) mit einem Molekulargewicht von 1800 abgespalten (Bettelheim u. Bailey 1952), wobei zu beobachten ist, daß zuerst das Fibrinopeptid A von der α -Kette und erst nach einer gewissen Latenzzeit das Peptid B von der β -Kette getrennt wird. (Bailey et al. 1951, Blombäck et al. 1966, Blombäck et al. 1978)

Es scheint so zu sein, daß durch die Abspaltung von Fibrinopeptid A eine Konformationsänderung des Fibrinogenmoleküls eintritt, die erst die Abspaltung des Fibrinopeptids B ermöglicht (Laki u. Mommaerts 1954). Nach zeitlich begrenzter Thrombineinwirkung ist also in den meisten Fällen nur die Abspaltung von Peptid A zu erwarten. Es entsteht ein Fibrinogenrestmolekül, das durch die Formel $2 (\alpha, \beta, \gamma)$ zu beschreiben ist und als Des-A-Fibrinmonomer bezeichnet werden kann.

Sind beide Fibrinopeptide abgespalten (A und B), sprechen wir von einem Des-AB-Fibrinmonomer, dem die Formel 2 (α, β, γ) entspricht. Die Spaltung findet sowohl in der α - wie in der β -Kette zwischen den Aminosäuren Arginin und Glycin statt (Blombäck 1967). Dabei werden Bindungsstellen freigelegt, die es den Fibrinmonomeren erlauben zu polymerisieren.

Es wird vermutet, daß durch die Abspaltung von Peptid A eine Bindungsstelle freigelegt wird, die vor allem eine End-zu-End Anlagerung ermöglicht. Es entstehen Fibrinoligomere in Form von Ketten. Erst durch die Abspaltung des Fibrinopeptids B wird eine Bindungsstelle an der β -Kette frei, die die Möglichkeit zur Seit-zu-Seit Anlagerung gibt (Edgar u. Prentice 1977, Blombäck et al. 1978).

Diese Aggregate bilden ein reversibles Fibrinnetz, das noch in 5 M Harnstoff löslich ist. Erst durch die Wirkung des aktivierten fibrinstabilisierenden Faktors (FSF= Faktor XIII), einer Transglutaminase, werden unter NH_3 -Abspaltung kovalente Bindungen zwischen den Fibrinmonomeren hergestellt, so daß sich ein in Harnstoff unlösliches Fibrinnetz bildet (Pizzo et al. 1973, Ly et al. 1974).

Die Polymerisation der Fibrinmonomere untereinander zu Oligomeren und in der Folge zu Fibrinnetzen ist jedoch nicht die einzige Reaktion der veränderten Fibrinogenmoleküle. Gleichzeitig zu der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin entstehen eine Reihe löslicher Zwischenprodukte in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer des Thrombins. Viele Arbeiten deuten daraufhin, daß es sich dabei um Komplexe zwischen Fibrinmonomeren oder Oligomeren mit Fibrinogen handelt, so daß das Fibrin im Plasma löslich bleiben kann.

Auf die Existenz löslicher Zwischenprodukte bei der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin schloß man zuerst durch die Beobachtung sogenannter Parakoagulationsreaktionen. Durch Abkühlung, Veränderung der Ionendichte oder Zugabe von Äthanol

läßt sich eine Gelbildung im Plasma von Patienten auslösen, die prädisponierende Bedingungen für das Auftreten thromboembolischer Komplikationen aufweisen (Apitz 1937, Korst u. Kratochvil 1955, Lyons 1945, Cummine u. Lyons 1948, Godal u. Abildgaard 1966). Dazu gehören das letzte Drittel der Schwangerschaft, die Geburt, das frühe Wochenbett (Beller 1963, Gurewich u. Grinspoon 1956, Hafter et al. 1975, Graeff et al. 1973), der Neugeborenen-Status (v. Hugo u. Graeff 1973a, Kuhn et al. 1971), postoperative Zustände (v. Hugo et al. 1977c), der Schock (Heene 1973) und fortgeschrittene Krebsstadien (Kuhn et al. 1974, Hafter et al. 1976, v. Hugo et al. 1979a).

Daß es sich bei der Gelbildung nicht um einen unspezifischen Niederschlag handelt, sondern um eine beginnende Fibrinummwandlung, konnte durch den Nachweis von freien Fibrinopeptiden in den Lösungen mit Hilfe der N-terminalen Analyse der Peptidketten (nach Edmann u. Sjöquist 1956) bewiesen werden (Blombäck u. Yamashina 1958, Abildgaard 1965, Nossel et al. 1974).

Parakoagulationsreaktionen sind also im Plasma von Patienten mit Hyperkoagulabilität auslösbar und scheinen ein Nachweis für lösliche Fibrinmonomerkomplexe zu sein.

Mit Hilfe der Gelfiltration war es Graeff et al. (1973a) möglich, die löslichen Fibrinmonomerkomplexe (LFMK) näher zu beschreiben. Die LFMK wurden in einer Schulter vor dem Fibrinogenpeak eluiert, waren im Vergleich zu Fibrinogen also höhermolekular und konnten durch FR-Antigeneigenschaft als Fibrinogenderivate charakterisiert werden. Die Fraktionen der Vorschulter zeigten in der SDS-Elektrophorese eine relative elektrophoretische Mobilität von $0,28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$, was im Vergleich zu der Wanderungsgeschwindigkeit der Fibrinogenbande dafür spricht, daß es sich bei diesen Fibrinogenderivaten um Dimere handelt.

Kierulf (1973) bestimmte mit der SDS-Elektrophorese für das lösliche Fibrin ein Molekulargewicht von etwa 700 000, was

ungefähr dem zweifachen Molekulargewicht des Fibrinogens entspricht. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Smith und Bang (1972) mit der Agarose-Gelfiltration und Harder und Straub (1972) mit der Ultrazentrifuge.

Ein kleinerer Teil des löslichen Fibrins wurde zwischen Schulterbereich und Ausschlußvolumen eluiert und zeigte in der Elektrophorese eine relative elektrophoretische Mobilität von 0,18 (Graeff et al. 1973 a). Benabid et al. (1977) konnten bei ihren Untersuchungen des löslichen Fibrins dieses Elutionsmuster bestätigen. Auch sie fanden dimere Fibrinogenderivate im Bereich der Schulter vor dem Fibrinogenpeak und konnten in den Fraktionen davor auch höhere Polymere des Fibrins nachweisen.

Diese höhermolekularen LFMK werden vor allem bei Krankheiten gefunden, die mit einer disseminierten intravaskulären Gerinnung einhergehen (Graeff et al. 1973a, 1976b, 1978, 1979, Graeff u. v. Hugo 1972, 1974, v. Hugo u. Graeff 1973b, v. Hugo et al. 1975, Hafter et al. 1975, 1976, 1977, Ebert u. Beller 1979, Fletcher u. Alkjaersig, Heene 1971).

Die Einführung der Affinitätschromatographie an Agarose gebundenem Fibrinogen nach Heene und Matthias (1973) ermöglichte eine weitere Charakterisierung der LFMK.

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie konnten v. Hugo et al. 1975b zeigen, daß dimere LFMK zu gleichen Teilen aus Fibrin und Fibrinogen bestehen. In ihrer in vitro Studie stellten sie LFMK durch kurze Inkubation einer Fibrinogenlösung mit kleinen Thrombinmengen her. Nach Agarose-Gelfiltration adsorbierte nahezu die Hälfte des 0,28 Derivats bei der Affinitätschromatographie an Agarose fixiertem Fibrinogen während die andere Hälfte eluiert wurde.

Das eluierte Material war mit Thrombin gerinnbar und seine elektrophoretische Beweglichkeit entsprach der des Fibrinogens. Das adsorbierte Material polymerisierte spontan in einer Pufferlösung mit physiologischer Ionenstärke und physiologischem pH und konnte durch den Nachweis von α , β und γ -Ketten

in der Elektrophorese als Fibrin identifiziert werden.

Die Dissoziation der LFMK während der Affinitätschromatographie mit Freisetzung des Fibrinogenanteils in Gegenwart eines Puffers physiologischer Ionenstärke und pH wirft die Frage auf, ob es unter in vivo Bedingungen ebenso leicht zur Dissoziation des dimeren Komplexes kommen kann.

Verschiedene Eliminationsraten von Fibrinogen und Fibrin beim Kaninchen unterstützen ebenfalls das Konzept, daß auch in vivo Fibrinogen-Fibrinmonomerkomplexe dissoziierbar sind.

Durch die vorliegende Arbeit soll untersucht werden, ob niedermolekulare LFMK, die während der Hyperkoagulabilität im Tierversuch entstanden sind, auch in vivo dissoziieren und damit, analog der Ergebnisse der Affinitätschromatographie, der Fibrinogenanteil in zirkulierenden LFMK ausgetauscht werden kann.

B Konzeption des Versuchs

Um die LFMK in vivo untersuchen zu können, muß ein Zustand geschaffen werden, in dem die LFMK im lebenden Organismus vermehrt auftreten.

Durch eine einmalige Endotoxinapplikation wird beim Kaninchen eine Hyperkoagulabilität ausgelöst. Hafter et al. beschrieben 1977, daß bei nicht schwangeren Kaninchen nach der ersten Endotoxininjektion noch keine Fibringerinnsel ausfielen, dafür aber LFMK in großer Menge auftraten. Erst nach einer zweiten Endotoxininjektion ging die Hyperkoagulabilität in das sogenannte Sanarelli-Shwartzman-Phänomen über, eine Form der disseminierten intravaskulären Gerinnung (s.a. Thomas et al. 1954, Müller-Berghaus 1969, v.Hugo et al. 1975).

In meiner Arbeit nutze ich diese Anordnung und versuche, die LFMK-Bildung im Kaninchen durch eine einmalige intravenöse Endotoxininjektion anzuregen. Die Erhöhung des LFMK-Spiegels ist durch das Auftreten einer Vorschulter im Elutionsprofil bei der Agarose-Gelfiltration zu belegen.

Die Bildung der LFMK wird dann durch Heparin gestoppt und danach gereinigtes, radioaktiv markiertes Fibrinogen intravenös appliziert. Durch die radioaktive Markierung soll es möglich werden, den Einbau des nachträglich verabfolgten Fibrinogens in die schon zirkulierenden, im Stadium der Hyperkoagulabilität gebildeten LFMK nachzuweisen. Es müßte sich dann radioaktiv markiertes Material in den Fraktionen der Vorschulter bei der Agarose-Gelfiltration finden lassen.

Durch die Affinitätschromatographie soll die Dissoziation der LFMK in vitro noch einmal belegt werden. Radioaktiv markiertes Fibrinogen müßte im ersten Eluat nachgewiesen werden können, während der Fibrinmonomeranteil der LFMK an dem unlöslichen Fibrinogen des Gels adsorbiert. Im zweiten Eluat, nach dem Pufferwechsel, dürfte kein markiertes Material zusammen mit den Fibrinmonomeren auftauchen, wenn erstens eine vollständig

Dissoziation der LFMK während der Affinitätschromatographie stattgefunden hat und zweitens während des Versuchs in vivo das markierte Fibrinogen nicht zu Fibrin abgebaut wurde.

C Material und Methoden

1. Fibrinogen

Menschliches Fibrinogen wurde nach der Methode von Blombäck und Blombäck (1956) bis zur Stufe I-4 gereinigt. Das Präparat wies eine Gerinnbarkeit von mehr als 95 % auf.

Dann wurde das Fibrinogen nach der Jod-Monochlorid-Methode von Mc Farlane (1958) mit dem Isotop ^{125}J markiert.

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Nach der Markierung wurde das ^{125}J -Fibrinogen der Agarose-Gelfiltration unterzogen. Durch die Aufzeichnung der ^{125}J -Aktivität im Elutionsprofil (Abb.1) wurde deutlich, daß das Fibrinogen während der Markierung Aggregations- und Degradationsprozessen unterlag.

Um polymerisiertes oder abgebautes Fibrinogen auszuschließen, wurden nur die Fraktionen im Experiment verwendet, die bei der Gelfiltration im Fibrinogenpeak zwischen 70 und 90 ml eluiert wurden (Abb.1).

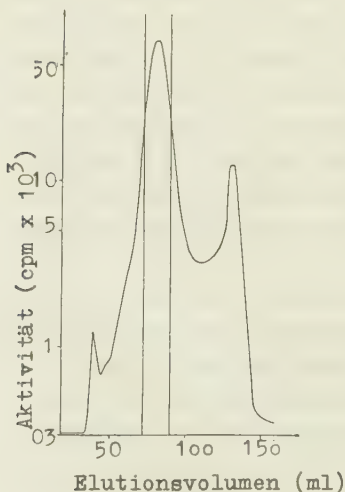


Abb.1
Agarose-Gelfiltration von gereinigtem Fibrinogen (Stufe I-4) nach Markierung mit ^{125}J . Das Elutionsprofil zeigt Aggregations- und Degradationsprodukte des Fibrinogens. Nur die Fraktionen zwischen 70 und 90 ml wurden für den Versuch verwendet.

2. Tiere und Versuchsaufbau

Für den Versuch wurden weibliche, nicht schwangere Kaninchen herangezogen, die zwischen 2 und 2,5 kg wogen. Die drei letzten Tage vor dem Versuch wurden sie nur noch mit Schrot gefüttert und bekamen Wasser ad libitum mit einem Zusatz von NaJ (1 g/l).

Das Experiment begann mit einer Endotoxininjektion (150 $\mu\text{g/kg}$ S. enterides No 2333575 (Difco, Ditroit, USA) in 0,15 M NaCl) in die laterale Ohrvene des Tieres.

Nach 6 Std. bekam das Tier 1000 U/kg Heparin (Liquemin, Roche, Grenzach) intravenös appliziert und 10 Minuten später wurde das 125 J-Fibrinogen (2 $\mu\text{Ci/kg}$ in 0,1 M Tris-Cl-Citrat-Puffer, pH 7,6) in die kontralaterale Ohrvene injiziert.

Nach weiteren 30 Minuten wurde durch Herzpunktion 9 ml Blut mit einer Einmalspritze mit 1 ml Antikoagulanze (3,8 g Trisodium-Citrat, 1,38 g TES = Tris-(hydroxy-methyl)-methyl-2 aminoäthansulfonsäure, 10 ml Trasylol (Bayer, Leverkusen) auf 100 ml, pH 7,5) entnommen. (Abb.2)

Das Tier wurde gleich nach der Blutentnahme mit 0,5 g Pentobarbital getötet.

Dieser Versuch wurde an 4 Kaninchen durchgeführt. Weitere 4 Kaninchen bekamen das Lösungsmittel (0,15 M NaCl) ohne Endotoxin bei sonst gleichbleibender Versuchsanordnung. Sie dienten als Kontrolltiere.

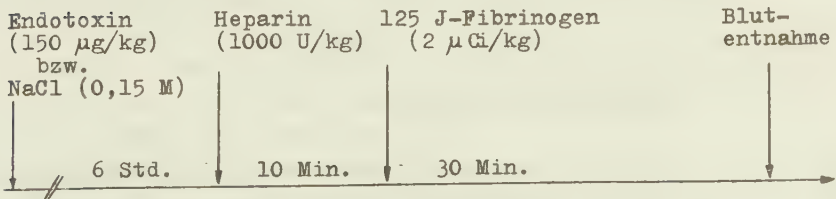


Abb.2: Versuchsaufbau

3. Plasmaaufbereitung

Das Blut wurde gleich nach der Entnahme sorgfältig mit dem Antikoagulanzen vermischt und 10 Min. lang bei 1200 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und noch einmal 10 Min. bei 2000 g zentrifugiert.

Das so gewonnene Plasma wurde entweder gleich weiterverarbeitet (Agarose-Gelfiltration, Fällung mit β -Alanin) oder bei -25° C bis zu 8 Tagen eingefroren.

4. Anreicherung von Fibrinogen und seinen Derivaten durch Fällung mit β -Alanin

Die Anreicherung wurde nach der Methode von Straughn und Wagner (1966), modifiziert nach Graeff und v.Hugo (1972), vorgenommen.

Zu 2 ml Plasma wurden unter langsamen Rühren im Eiswasserbad innerhalb von 10 Min. 2 ml 40prozentige β -Alaninlösung zuge tropft (Endkonzentration 2,5 m). Nach weiteren 10 Min. Rühren wurde der Niederschlag bei 5000 g (5 Min., 4° C) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbleibende Präzipitat in 3 ml Glyzin aufgeführt. Diese Lösung wurde wieder bei 5000 g (5 Min., 4° C) zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Präzipitat wurde in 2 ml TES-Trasylool-Citrat-Puffer (0,06 m TES, 0,081 m NaCl, 0,0129 m tri-Na-Citrat, 1000 KIE Trasylool (Bayer, Leverkusen) pro ml, pH 7,5) gelöst und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde gleich der Agarose-Gelfiltration unterzogen.

5. Agarose-Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte an 4% Agarose (Biogel A 15, 100-200 mesh, Bio-Rad Lab., München). (Näheres über die Methode bei Hafer und Graeff (1976))

a. Das durch Fällung mit β -Alanin angereicherte Fibrinogen wurde auf eine 1,5 x 80 cm Säule aufgetragen und mit 0,1 M Tris-Cl-Citrat-Puffer (pH 7,6) eluiert. Die Durchflußrate im freien Fall betrug 13 ml/h.

Die optische Dichte des Eluats wurde gleichzeitig durch ein Spektralphotometer (Hitachi 185) bei 280 nm gemessen und in Kombination mit einem log TE Transformer (Multianalog 201, Optilab, Schweden) und einem Rekorder (W + W 1100, Basel, Schweiz) aufgezeichnet.

b. Die Gelfiltration des Vollplasmas erfolgte an einer 2,4 x 80 cm Säule mit 4% Agarose und dem gleichen Puffer wie oben beschrieben.

Es wurden Plasma~~ma~~proben gleicher Radioaktivität (80 000 cpm) auf die Säule aufgetragen. Das Eluat wurde automatisch in Einzelfractionen zu je 3 ml aufgefangen.

Die 125 J-Aktivität dieser Fractionen wurde mit Hilfe eines Gamma-Szintillationszählers (Friesecke und Höpfner, Erlangen) gemessen und für jede Fraction auf halblogarithmisches Papier aufgetragen.

Der Szintillationszähler wies eine Sensibilität von ca. 10^6 cpm/ μ Ci 125 J mit einem Nulleffekt von 300 cpm auf.

6. Berechnung des relativen Gehaltes an LFMK im Plasma

a. Die Elutionsprofile des durch β -Alanin gefällten Plasmas wurden planimetrisch ausgewertet, um den prozentualen Anteil der LFMK am Gesamtfibrinogengehalt zu bestimmen.

LFMK werden vor dem Fibrinogenpeak eluiert (Graeff et al. 1973). Dieser Teil des Elutionsvolumens, auf Abb.3 mit A bezeichnet, wurde planimetriert und mit der Fläche des Fibrinogenpeaks (B) verglichen.

Das Planimetrieren erfolgte durch Ausschneiden der entsprechenden Flächen unter der Kurve und Auswiegen der Papierabschnitte auf der Analysenwaage.

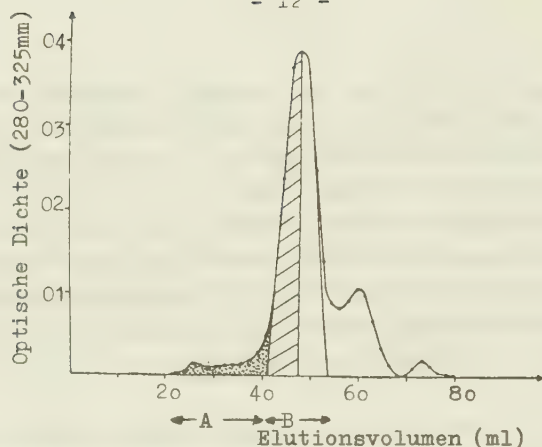


Abb.3:
Elutionsprofil nach Agarose-Gelfiltration B-Alanin gefällter
Plasmaproben. Optische Dichte bei 280-325 nm.
Der Kurvenabschnitt vor dem aufsteigen Teil des Fibrinogen-
peaks (A) wird mit dem des Fibrinogenpeaks (B) verglichen.

Der prozentuale Anteil der LFMK am Gesamtfibrinogengehalt
ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Prozent LFMK} = \frac{A}{A + B} \times 100$$

wobei A und B in mg in die Formel eingesetzt wurden.

b. Die Elutionsprofile der 125 J-Aktivität nach Agarose-
Gelfiltration wurden ähnlich ausgewertet.

Die gesamte 125 J-Aktivität, die in den Fraktionen vor dem
Fibrinogenpeak eluiert wurden (Elutionsvolumen A), wurde mit
der gesamten 125 J-Aktivität verglichen, die im Fibrinogen-
peak eluiert wurde (Elutionsvolumen B) und in Prozent
(A von A + B) ausgedrückt.

7. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wurde nach Heene und Matthias (1973) vorgenommen. Die Methode wurde insoweit abgewandelt, als Fibrinogen mit einer Gerinnbarkeit von mehr als 95% an Sepharose 6 B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gebunden wurde und ein Dissoziationspuffer mit einem pH von 5,3 für die Elution des adsorbierten Materials benutzt wurde (0,05 M Tris, 1 M KBr, 0,025 M EACA) (nach Stemberger u. Hörmann 1976). Das Prinzip der Methode ist, daß die Elution der Plasmaproben mit den LFMK durch das Filtergel mit zwei aufeinanderfolgenden Puffern erfolgt.

1. Während der Elution mit dem ersten Puffer (0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,025 M EACA, pH 7,6) adsorbiert der Fibrinmonomeranteil der LFMK an dem agarose-gebundenem Fibrinogen (Fg-ag) des Filtergels und bleibt in der Säule zurück, während der Fibrinogenanteil der LFMK dissoziiert und ausgeschwemmt wird (Abb. 4, Peak A).

2. Durch den Dissoziationspuffer (s.o.) wird der Fibrinmonomeranteil vom Fg-ag wieder gelöst und eluiert (Abb.4, Peak B).

Das Fg-ag wurde in 0,5 x 2 cm Säulen gefüllt und Plasmaproben mit einer Radioaktivität von ca. 70 000 cpm auf die Säule aufgetragen. Die Durchflußrate von 6 ml/h wurde durch eine Pumpe (Perpex, LKB,Fahr/R.) gewährleistet. Die Trennung fand bei 40° C statt.

Die automatische Aufzeichnung der optischen Dichte des Eluats (Methode wie bei 5a) ermöglichte den richtigen Zeitpunkt des Pufferwechsels nach vollständigem Abfall des Fibrinogenpeaks. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen und die 125 J-Aktivität jeder einzelnen Fraktion gemessen.

Die Adsorptionsrate radioaktiv markierten Fibrinogens wurde bestimmt durch den prozentualen Anteil der 125 J-Aktivität des Materials, das an Fg-ag adsorbierte (Peak B) zur gesamten eluierten 125 J-Aktivität (Peak A + B).

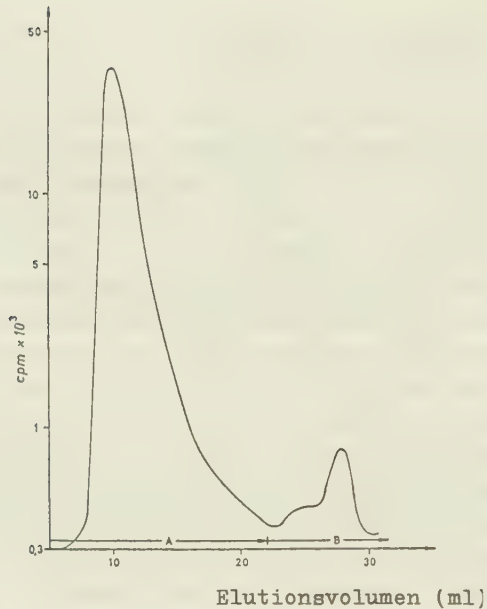


Abb. 4:

125 J-Aktivität nach Affinitätschromatographie. Der Fibrinogenanteil der LFMK (Peak A) wird während des ersten Puffers eluiert, während der Fibrinmonomeranteil der LFMK an dem agarosegebundenen Fibrinogen adsorbiert und erst mit dem zweiten Puffer eluiert wird (Peak B).

8. Statistische Methoden

Es wurde der Wilcoxon Test für unverbundene Stichproben angewandt. Signifikant war ein p-Wert von weniger als 0,05 (Sachs, 1974).

D Ergebnisse

1. Relativer LFMK-Gehalt

Die Endotoxin-Injektion führte bei den Versuchstieren zu einem Anstieg des LFMK-Spiegels. Die LFMK wurden bei der Agarose-Gelfiltration des β -Alanin gefällten Plasmas vor dem Fibrinogen-Peak eluiert (Abb.5, schraffierter Teil). Das Planimetrieren dieser Fläche ergab bei den Versuchstieren einen relativen LFMK-Gehalt am Gesamtfibrinogen von $12,5 \% \pm 1,5$ (Mittelwert und Standardabweichung) (Abb.5 a), während bei den Kontrolltieren nur $3,5 \% \pm 0,9$ LFMK nachzuweisen waren (Abb.5 b) (Tab.1).

2. 125 J-Fibrinogen in den LFMK-Fraktionen

Der Injektion von 125 J-Fibrinogen folgte das Auftreten von markiertem Fibrinogen in den LFMK. 125 J-Fibrinogen konnte bei den Kontrolltieren nach Agarose-Gelfiltration des Vollplasmas in allen Fraktionen des Eluates, vom Ausschlußvolumen bis zum Fibrinogenpeak nachgewiesen werden.

Vor dem Fibrinogenpeak, in den LFMK-Fraktionen, konnte bei den Versuchstieren eine Anhäufung der 125 J-Aktivität beobachtet werden (Abb. 6 a), während bei den Kontrolltieren kaum Aktivität vor dem Fibrinogenpeak eluiert wurde (Abb. 6 b).

Die Summe der 125 J-Aktivität, die in den Fraktionen vor dem Fibrinogenpeak eluiert wurde, betrug bei den Versuchstieren durchschnittlich $4,4 \% \pm 1,2$ der gesamten eluierten Aktivität verglichen mit $1,2 \% \pm 0,4$ bei den Kontrolltieren (Tab.1).

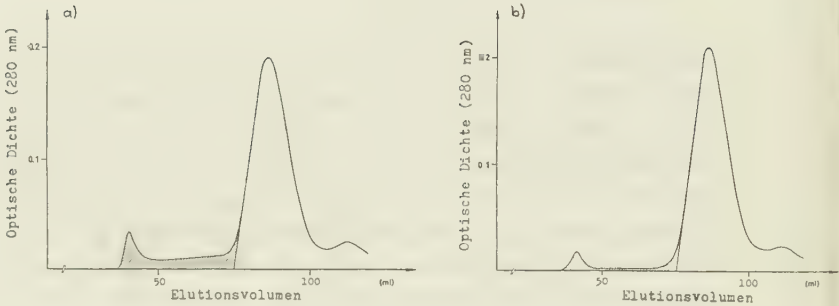


Abb.5:

Elutionsprofile nach Agarose-Gelfiltration β -Alanin gefällter Plasmen. Die LFMK (schraffierte Teile) wurden vor dem Fibrinogenpeak eluiert. Links: Endotoxin behandelte Tiere; rechts Kontrolltiere.

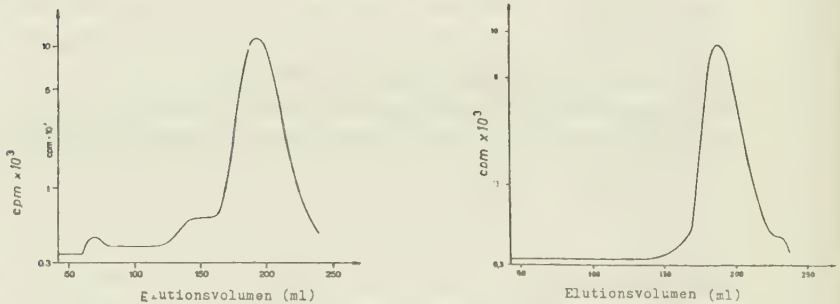


Abb.6:

Elutionsprofile nach Agarose-Gelfiltration von Vollplasma. 125 J-Fibrinogen wurde in die LFMK eines Versuchstieres eingebaut (links), während das Kontrolltier kaum 125 J-Aktivität vor dem Fibrinogenpeak aufweist (rechts).

3. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Adsorption von markiertem Material an unlöslichem Fibrinogen zwischen Versuchs- und Kontrolltieren.

Bei den Versuchstieren wurde durchschnittlich $2,5 \% \pm 0,6$ des gesamten 125 J-Fibrinogen an Fg-ag adsorbiert und in der Kontrollgruppe durchschnittlich $2,8 \% \pm 0,8$. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Tab.1).

	Versuchs- gruppe		Kontroll- gruppe		Signifi- kanz der Differenz
	M	$\pm S$	M	$\pm S$	
% LFMK vom Gesamtfibrinogen	12,5	1,5	3,5	0,9	$p < 0,005$
% 125J-Aktivität der LFMK von der Gesamtaktivität	4,4	0,9	1,2	0,4	$p < 0,005$
% Adsorption an Fg-ag	2,5	0,6	2,8	0,8	$p > 0,05$

Tab. 1:

Ergebnisse der Agarose-Gelfiltration von β -Alanin gefällten Plasma (Reihe 1), der Agarose-Gelfiltration von Vollplasma (Reihe 2), der Affinitätschromatographie (Reihe 3). Die angegebenen Werte sind die arithmetischen Mittelwerte von jeweils 4 Tieren. Die p-Werte geben die Signifikanz der Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen an. p-Werte von weniger als 0,05 bezeichnen statistisch signifikante Differenzen.

E Diskussion

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß es möglich war, durch eine einmalige Endotoxin-Injektion eine Hyperkoagulabilität beim Kaninchen auszulösen.

Die Agarose-Gelfiltration zeigte nach Anreicherung der Fibrinogenderivate durch β -Alanin-Fällung bei den Versuchstieren einen Anstieg der löslichen Fibrinmonomerkomplexe auf 12,5%, während der LMPK-Spiegel bei den Kontrolltieren mit durchschnittlich 3,5 % in den normalen physiologischen Grenzen liegt.

Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von Hafter et al.(1975), in der gezeigt wird, daß nach der ersten Endotoxin-Injektion die LMPK 10% des Gesamtfibrinogens ausmachen.

Als weitere Zeichen der Hyperkoagulabilität werden dort ein Anstieg der Fibrinogenkonzentration und eine Thrombopenie beschrieben, der Äthanol-Gelations-Test (EGT) fällt positiv aus (Mc.Kay u.Shapiro 1958, De Prez et al. 1971). Diese prokoagulatorische Wirkung ist möglicherweise auf den Einfluß des Endotoxins auf Thrombozyten zurückzuführen, die aggregieren und Thrombozytenfaktor 3 freisetzen. Außerdem führt die Veränderung der Gefäßwände durch Endotoxine zur Freisetzung thromboplastischer Substanzen und zur Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems über Kontaktfaktoren. Auf der anderen Seite beeinträchtigen Endotoxine die Phagozytosefunktion des RES und hemmen die Fibrinolyse (Müller-Berghaus 1969, Müller-Berghaus u.Lasch 1975). Dieses komplexe Geschehen stellt möglicherweise einen ersten, wahrscheinlich noch reversiblen Schritt bei der Entwicklung einer disseminierten intravasalen Gerinnung dar (v.Hugo 1980).

Erst nach einer zweiten Endotoxin-Injektion wird beim Kaninchen eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) im Rahmen einer generalisierten Shwartzman-Reaktion ausgelöst. Hierbei treten neben glomerulären Mikrothromben höhermolekulare lösliche Fibrinderivate auf.

Die nach einmaliger Endotoxingabe entstehenden LFMK zeigen in der Elektrophorese eine relative elektrophoretische Beweglichkeit von 0,28 und scheinen den in vitro erzeugten dimeren LFMK zu entsprechen (Graeff et al.1973a).

Die bei den Kontrolltieren auftretenden 3,5 % LFMK stimmen mit den Befunden von v.Hugo und Graeff (1973) überein, die geringe Mengen LFMK bei gesunden, nicht graviden Kaninchen feststellen konnten. Auch bei gesunden Menschen treten LFMK-Spiegel um 2,8 % auf (Hafter et al.1975). Sie scheinen mit der Verstoffwechselung von Fibrinogen über Fibrin zusammenzuhängen. Die Menge ist jedoch so gering, daß in keinem Fall ein positiver EGT ausgelöst werden konnte (v.Hugo 1980).

Nach der Injektion von 125 J-Fibrinogen war es möglich, markiertes Fibrinogen in den LFMK nachzuweisen. Nach Agarose-Gel-Filtration trat markiertes Material in allen Fraktionen - vom Ausschlußvolumen bis zum Fibrinogenpeak- auf. Mit den LFMK-Fraktionen wurden 4,4 % des 125 J-Fibrinogens eluiert. Dieser Befund gibt einen Anhalt dafür, daß LFMK während der Hyperkoagulabilität mit Fibrinogen in Wechselwirkung treten. Eine unspezifische Wechselwirkung von markiertem und nativen Fibrinogen ist unwahrscheinlich, da kein markiertes Material in den hochmolekularen Fraktionen der Kontrolltiere auftrat.

Außerdem ist auszuschließen, daß das markierte Fibrinogen selbst durch Thrombineinwirkung zu LFMK umgebaut wurde, da vor der Injektion des markierten Fibrinogens mit Heparin antikoaguliert wurde.

In der Affinitätschromatographie war außerdem - sowohl bei der Versuchs- wie auch der Kontrollgruppe - kaum markiertes Material im Eluat der Fibrinmonomerfraktion zu finden.

Das 125 J-Fibrinogen wurde also nicht zu Fibrinmonomeren abgebaut.

Das markierte Fibrinogen muß in vivo in die zirkulierenden löslichen Fibrinmonomerkomplexe eingebaut worden sein.

Das stimmt mit den Befunden von Jacobsen et al.(1974) überein, die den Einbau von Fibrinogen in LFMK in vitro nachweisen konnten.

Jacobsen et al. arbeiteten mit einer gereinigten Fibrinogenlösung, in der die LFMK durch kurzzeitige Inkubation mit Thrombin hergestellt wurden. Nachdem der Fibrinogenabbau mit Hirudin gestoppt war, folgte der Zugabe von markiertem Fibrinogen zu der Lösung in der nachfolgenden Gelfiltration markiertes Material in den LFMK-Fraktionen.

Der Einbau des markierten Fibrinogens gelang nicht bei Fibrinogenlösungen, die lange mit Thrombin inkubiert worden waren.

Geht man davon aus, daß dimere LFMK mit der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 0,28 aus einem Fibrinmonomer und einem Fibrinogenmolekül bestehen, so kann der Einbau des markierten Fibrinogens in die LFMK nur stattgefunden haben, indem das 125 J-Fibrinogen das ursprüngliche Fibrinogen aus den LFMK verdrängt hat.

Dieser Austausch des Fibrinogens spricht dafür, daß LFMK einen dissoziablen Fibrinogen-Fibrinmonomer-Komplex bilden.

Auch Heene und Matthias zeigten den Austausch des Fibrinogenanteils in LFMK mit Hilfe der von ihnen entwickelten Affinitätschromatographie.

LFMK wurden durch eine Gelsäule geschickt, in der Fibrinogen, fest an Agarose gekoppelt, vorlag (Fg-ag). Beim Durchfluß dissoziierten die LFMK bei einem bestimmten Puffer (pH 7,6) und die Fibrinmonomere adsorbierten an dem Fg-ag, während der Fibrinogenanteil der LFMK eluiert wurde. Nach dem Pufferwechsel (pH 4,1) lösten sich die Fibrinmonomere wieder von dem Fg-ag und wurden in einem zweiten Peak eluiert.(Näheres über die Methode s. Heene und Matthias 1973).

Diese Methode erwies sich als sehr wirkungsvoll, um die einzelnen Komponenten der LFMK und deren Dissoziationsvermögen und Austauschbarkeit nachzuweisen.

Nachdem Jacobsen et al. (1974) und Heene und Matthias (1973) in vitro den Austausch des Fibrinogens in LFMK zeigen konnten, geben die vorliegenden Befunde einen ersten Anhalt dafür, daß eine Dissoziation der Fibrinmonomerkomplexe auch in vivo während der Hyperkoagulabilität stattfindet.

Damit wäre auch die Beobachtung zu erklären, daß Fibrinogen und Fibrinmonomere im Kreislauf verschieden lange Halbwertszeiten haben (Müller-Berghaus 1976 u.1978).

Die Voraussetzung für eine Dissoziation der LFMK ist das Fehlen einer kovalenten Bindung zwischen Fibrinogen und Fibrinmonomer. Hafter et al. (1977) haben gezeigt, daß LFMK, die nach einer einmaligen Endotoxininjektion im Kaninchen auftraten, in der SDS-Elektrophorese in der Gegenwart von 6 M Harnstoff nicht als Dimere nachzuweisen waren. Die Bindungen der Komplexe waren also in Harnstoff löslich, d.h. nicht kovalent. Auch nach Reduktion mit Merkaptoäthanol waren in der PAA-Elektrophorese nur die Bänder der einzelnen Protein-Ketten und keine dimeren γ - γ -Ketten zu sehen.

Zu den gleichen Ergebnissen kamen Ly et al. (1974). Sie konnten keine kovalenten Bindungen zwischen den γ -Ketten von LFMK nachweisen, die durch kurze Thrombineinwirkung auf Fibrinogen entstanden waren. Erst nach der Einwirkung des fibrinstabilisierenden Faktors (PSF) konnten in der Elektrophorese kovalente Bindungen zwischen den γ -Ketten der höhermolekularen Fibrinogenderivate nachgewiesen werden; es entstanden mit Hilfe des PSF allerdings hauptsächlich Oligomere, die niedermolekulare LFMK-Fraktion war kleiner geworden.

Auch in ihrem Tierversuch kamen Hafter et al. (1977, s.o.) zu diesem Ergebnis: erst nach der 2. Endotoxin-Injektion konnten im Rahmen einer DIG kovalente Bindungen zwischen den γ -Ketten gefunden werden. In diesem Stadium war der Anteil der niedermolekularen gegenüber den höhermolekularen LFMK gesunken und die Tiere zeigten glomeruläre Fibringerinnsel.

Diese Befunde bestätigen die Annahme, daß dimere LFMK nicht kovalent gebunden sind und daher dissoziieren können.

Shainoff und Page zeigten schon 1962 mit ihren Versuchen in gereinigten Fibrinogenlösungen, daß LFMK dissoziieren können, aber nur im Fibrinogenüberschuß löslich sind.

LFMK, die durch kurzzeitige Thrombineinwirkung auf Fibrinogen hergestellt worden waren, dissoziierten nach ihrer Isolierung von der Fibrinogenlösung in einer Ammoniumazetatlösung zu gleichen Teilen in lösliches Fibrinogen und ein Fibringerinnsel. Auf der anderen Seite konnte ein Fibringerinnsel, das noch nicht durch FSF stabilisiert worden war, im Fibrinogenüberschuß wieder aufgelöst werden und es entstanden LFMK. Shainoff und Page schlossen daraus, daß es sich bei den LFMK um eine Reaktion mit einem Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht zwischen Fibrinogen und Fibrinmonomer handelt. Sie beschrieben die Reaktion mit folgender Gleichung:



Nach der quantitativen Auswertung ihres Versuchs für physiologische Bedingungen beträgt die Gleichgewichtskonstante K

$$K = \frac{\text{Fibrinogen}}{\text{LFMK}} = 0,26.$$

Das heißt, 26 % LFMK in Bezug auf die Gesamtfibrinogenkonzentration müssen gebildet werden, bevor Fibrin ausfällt.

Dieses Modell, nach dem die LFMK als Puffersystem dienen, um in der Anfangsphase der Gerinnung die Fibrinmonomere löslich zu halten, haben auch Brass et al. (1976) nahegelegt. Sie untersuchten die LFMK mit der Laser-Fluktuations-Spektroskopie zur weiteren Charakterisierung eines möglichen Dissoziationsgleichgewichts der LFMK.

Die Größenordnung der von Shainoff und Page errechneten Gleichgewichtskonstante K von 0,26 konnten Hafter et al. in ihrem Tierversuch (1977) bestätigen. Nach der 2. Endotoxin-Injektion stieg der LFMK-Spiegel bis auf 23 % der Fibrinogenkonzentration

und erreichte damit nach Shainoff und Page den Schwellenwert der möglichen Löslichkeitsvermittlung durch Fibrinogen, was sich an beginnenden Fibrinablagerungen in den Glomerula der Kaninchen zeigte. Außerdem war ein hoher Prozentsatz quervernetzter, höhermolekularer LFMK nachweisbar (s.o.). Hafter et al. leiteten daraus ab, daß sich eine disseminierte intravaskuläre Gerinnung durch das vermehrte Auftreten kovalent gebundener Fibrinoligomere ankündigt.

In der vorliegenden Arbeit war der Austausch des Fibrinogens in den zirkulierenden LFMK besonders ausgeprägt in den Fraktionen der niedermolekularen LFMK, wie die hohe Radioaktivität nach Agarose-Gelfiltration in den Fraktionen kurz vor dem Fibrinogenpeak zeigt. Die niedermolekularen LFMK scheinen also vermehrt mit Fibrinogen in Wechselwirkung zu treten.

Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen einer Untersuchung von v.Hugo (1980) überein, in der dimere LFMK bei der Affinitätschromatographie zu 43 % an Fg-ag adsorbierten, während höhermolekulare LFMK nur zu 21 % mit dem agarose-gebundenen Fibrinogen in Wechselwirkung traten.

Von Hugo zieht daraus den Schluß, daß Fibrinogen möglicherweise mehr zur Löslichkeitsvermittlung der niedermolekularen LFMK beitragen kann, als zu der der höhermolekularen LFMK. Diese Erscheinung ist durch ein von Kudryk et al. (1974) entwickeltes Modell über die Bindungsstruktur der löslichen Fibrinogen-Fibrinmonomer-Komplexe zu erklären.

Danach stehen in den Komplexen einem aktivierbaren Bindungszentrum am N-terminalen Disulfidknoten (N-DSK) ein nicht aktivierbares Bindungszentrum der Fragment D-Region gegenüber. In höhermolekularen LFMK liegt wahrscheinlich ein Teil der aktivierbaren Bindungszentren im Innern des Moleküls, so daß sie keine Komplexbildung mit Fibrinogen eingehen können. Deshalb ist es unwahrscheinlich, daß auch höhermolekulare LFMK zu gleichen Teilen aus Fibrinmonomeren und Fibrinogen bestehen (Brosstad 1979, v.Hugo 1980).

Der in dem hier vorliegenden Versuch nachgewiesene Austausch des Fibrinogens in zirkulierenden LFMK wirft die Frage auf, ob LFMK während der Hyperkoagulabilität in einem Dissoziationsgleichgewicht stehen.

Eine Reihe von Beobachtungen aus in vitro Versuchen sprechen für diese Vorstellung, wobei die Befunde zeigen, daß zwischen Des-A-Fibrin und Des-AB-Fibrin unterschieden werden muß. Blättler et al.(1974) untersuchten die Plasmaviskosität bei Freiwilligen, denen Reptilase infundiert worden war. Das Schlangengift Reptilase spaltet vom Fibrinogenmolekül nur das Fibrinopeptid A ab, so daß Des-A-Fibrin gebildet wird (Kwaan u.Barlow 1971).

Die Plasmen der Probanden zeigten bei 20° C eine deutlich höhere Viskosität als bei 37° C. Diesen Befund erklärten Blättler et al.damit, daß LFMK bei 37° C dissoziieren.

Eine temperaturabhängige Dissoziation von LFMK, die Des-A-Fibrin enthielten, konnten auch Edgar und Prentice (1979) und Hafter (1977) bei der Affinitätschromatographie und der Agarose-Gelfiltration nachweisen.

Hafter unterzog ein Plasmapool von Wöchnerinnen der Agarose-Gelfiltration bei 5 verschiedenen Temperaturen zwischen 12° und 40° C. Er stellte fest, daß bei hohen Temperaturen sehr viel weniger LFMK als Komplexe vor dem Fibrinogenpeak eluiert wurden (3,5 % LFMK) als bei niedrigen Temperaturen (6 % LFMK). Das Auftreten der Komplexe zeigte eine lineare, umgekehrt proportionale Abhängigkeit von der Temperatur.

Wenn bei höheren Temperaturen weniger Komplexe nachweisbar sind, muß man davon ausgehen, daß die Komplexe - vorausgesetzt sie fallen nicht aus - dissoziieren und ihre Bestandteile bei der Agarose-Gelfiltration zusammen mit dem Fibrinogen eluiert werden.

Diesen Nachweis erbrachten von Hugo et al.(1979b)durch den Einsatz von markiertem Fibrin. Zugleich machten sie eine quantitative Aussage über den Grad der Dissoziation bei verschiede

en Temperaturen.

Antikoagulierten Kaninchen wurde 125 J markiertes Des-A-Fibrin und DES-AB-Fibrin injiziert und die nachfolgende Agarose-Gelfiltration der Plasmen bei 20° und 37° C vorgenommen.

Es zeigte sich, daß bei 20° C 32 % des markierten Des-A-Fibrins zusammen mit dem Fibrinogenpeak eluiert wurde, also dissoziiert vorlagen. Bei 37° C waren sogar 76 % nicht als Komplexe nachweisbar.

Markierte Des-AB-Fibrinmonomere wurden dagegen bei 20° C ausschließlich vor dem Fibrinogen eluiert, lagen also insgesamt in komplexierter Form vor, während sie bei 37° C teilweise dissoziierten und zu 56 % als monomeres Fibrin im Fibrinogenpeak auftraten.

Brosstad (1979) konnte mit in vitro Versuchen ähnliche Verteilungsmuster für Des-A-Fibrin bei 20° C aufzeigen, wobei er eine leichte Dissoziation des Des-AB-Fibrins von 12 % bei 20° C beschreibt. Dagegen fanden Mahn et al. (1979) noch eine vollständige Stabilität der Des-AB-Fibrinpolymere bei 37° C. Diese Unterschiede in den Befunden können durch die verschiedenen experimentellen Ansätze erklärt werden (siehe v.Hugo, 1980).

Alle Befunde belegen aber die Beobachtung, daß Des-A-Fibrin bei Wärme stärker dissoziiert als Des-AB-Fibrin.

Dies stimmt mit der Annahme überein, daß durch die Abspaltung des Fibrinopeptids B ein zweites Bindungszentrum frei wird, das eine Lateralaggregation der Fibrinfäden ermöglicht (Latallo 1973, Blombäck et al. 1978, Edgar u. Prentice 1979).

Die Wärmedissoziation der Fibrinmonomere bei den in vitro Versuchen läßt vermuten, daß auch in vivo ein großer Teil der löslichen Fibrinmonomerkomplexe in dissoziierter Form vorliegt.

Allerdings kann von den Ergebnissen der in vitro Versuche nur bedingt auf das Verhalten der LFMK in vivo geschlossen werden. Die Aussagen über die Bindungsaktivität der LFMK können durch

eine ganze Reihe von spezifischen in-vitro-Bedingungen verfälscht werden (nach v.Hugo, 1980):

Durch die Markierung mit ^{125}J , durch die Lösung der in vitro hergestellten Fibrinmonomere in Harnstoff und durch die Untersuchung in Ca -Ionen-freien Lösungen wird die Polymerisationsfähigkeit der Fibrinmonomere verändert (Yorck u.Blombäck 1976, Yudelmann 1974, Brossad 1977, Endres u.Scheraga 1972).

Die Übertragbarkeit auf in vivo Verhältnisse muß also kritisch betrachtet werden.

Außerdem treten bei der Agarose-Gelfiltration wechselnde Fibrinogenkonzentrationen auf, die den Dissoziationszustand der LFMK beeinflussen (Sasaki 1966) und es ist noch unklar, inwieweit sich die Wechselwirkung von Agarosegel und LFMK bei 20° und bei 37°C entspricht (Shainoff u.Dardick 1980).

Es muß also diskutiert werden, ob die Agarose-Gelfiltration die geeignetste Untersuchungsform ist, um quantitative Aussagen über den Dissoziationsgrad der LFMK zu machen.

Trotz dieser Einschränkungen geben die bisherigen Ergebnisse einen Anhalt dafür, daß niedermolekulare LFMK in vivo in einem Dissoziationsgleichgewicht stehen.

Für den vorliegenden Versuch könnte das heißen, daß die niedermolekularen LFMK, die durch die Agarose-Gelfiltration bei 20°C erfaßt wurden, bei Körpertemperatur in der Zirkulation nicht als Komplexe, sondern hauptsächlich dissoziiert vorliegen.

Der Austausch des Fibrinogenanteils der LFMK, wie er in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, zeigt jedenfalls, daß es auch in vivo während der Hyperkoagulabilität zu einer Dissoziation der LFMK kommt.

Faßt man die bisherigen Erkenntnisse über die Eigenschaften der LFMK zusammen, so ergibt sich folgendes Bild über die frühe Phase der Fibrinbildung:

Das Gerinnungssystem wird beständig aktiviert, beim Gesunden nur minimal, bei bestimmten hyperkoagulablen Zuständen (wie im Wochenbett, nach Operationen, im Schock etc.s.S.3) in stärkerem Maße. Dies ist ein physiologischer Vorgang und obwohl Fibrin gebildet wird, fallen keine Gerinnsel aus, weil die Fibrinmonomere in der Komplexbildung mit Fibrinogen abgefangen werden.

Nach Einwirkung kleinster Thrombinmengen auf das Fibrinogen des Plasmas werden Des-A-Fibrinmonomere gebildet, die von einem Überschuß von Fibrinogenmolekülen umgeben werden. Die durch Abspaltung von Fibrinopeptid A aktivierte Bindungsstelle am N-DSK wird nacheinander von verschiedenen Fibrinogenmolekülen besetzt: es bilden sich ständig wechselnde Komplexbildungen zwischen Fibrinmonomer und Fibrinogen, die bei Körpertemperatur (37°C) im Dissoziationsgleichgewicht stehen. Erst wenn eine gewisse Anzahl von Fibrinmonomeren entstanden ist, wird die Wahrscheinlichkeit größer, daß sich zwei Fibrinmonomere zu einem Komplex verbinden. Auch dieser Komplex ist in Abwesenheit von aktiviertem FSF noch dissoziabel.

Nach der Abspaltung von Fibrinopeptid A wird durch eine Konformationsänderung am Fibrinmonomer die Abspaltung von Peptid B möglich. Dies geschieht jedoch erst nach längerer Thrombinwirkung zu einem Zeitpunkt, an dem schon vermehrt Fibrin-oligomere auftreten und eine Gelbildung auslösbar ist. Es entstehen Des-AB-Fibrin-oligomere, die bei 37°C nicht so leicht dissoziieren können wie Des-A-Fibrinmonomerkomplexe, weil sie durch das zweite Bindungszentrum zur Lateralaggregation befähigt sind und hauptsächlich als Oligomere vorkommen.

Bei Oligomeren liegen einige freie Bindungsstellen im Innern des Komplexes und stehen nicht zur Komplexbildung mit Fibrinogen zur Verfügung. Dadurch und durch das zunehmende Molekulargewicht entziehen sich die höhermolekularen LFMK immer mehr der Löslichkeitsvermittlung durch die sie umgebenden Fibrinogen-Moleküle.

Tritt eine weitere Aktivierung des Gerinnungssystems ein, so werden die Oligomere durch den nun aktivierten FSF quervernetzt und sind nicht mehr dissoziabel. Ist das retikuloendotheliale System nicht in der Lage, die anfallenden Oligomere aus der Zirkulation zu eliminieren, aggregieren die Fibrinfäden weiter und fallen bei einer bestimmten Größe als Mikrogerinnsel in den Gefäßen aus.

Lösliche Fibrinogen-Fibrinmonomer-Komplex wirken als Puffersystem in der frühen Phase der Blutgerinnung. Dadurch, daß diese Komplexe ständig dissoziieren und sich wieder neu bilden, wird ein komplexes Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Blutungsneigung aufrechterhalten, das bei bestimmten Belastungen des Organismus vermehrt Fibrinmonomere zur Gerinnselbildung bereitstellt (Hyperkoagulabilität), ohne daß Fibrin ausfällt.

F Zusammenfassung

Durch eine einmalige Endotoxin-Injektion wurde bei Kaninchen eine Hyperkoagulabilität ausgelöst. Diese zeigte sich in einem Anstieg des relativen LPMK-Gehaltes der Plasmen.

Nach Injektion von 125 J-Fibrinogen in die antikoagulierten Tiere war ein Einbau des markierten Fibrinogens in die zirkulierenden LPMK nachzuweisen.

Während der Affinitätschromatographie an agarose-gebundenem Fibrinogen dissoziierte das 125 J-Fibrinogen von den Fibrinmonomeren.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sprechen für die Annahme, daß zirkulierende lösliche Fibrinogen-Fibrinmonomer-Komplexe in vivo in einem Dissoziationsgleichgewicht stehen.

G Literaturverzeichnis

Abildgaard, U.:

N-terminal analysis during coagulation of purified human fibrinogen. Fraction I and plasma.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 17:529 (1965)

Apitz, K.:

Über Profibrin. I. Entstehung und Bedeutung des Profibrins im Gerinnungsablauf.

Z. ges. exp. Med. 101:552 (1937)

Bachmann, L., Schmitt-Kumian, W.W., Hampel, R., Lederer, D.: Size and shape of fibrinogen, electron microscopy of the hydrated molecule.

Makromol. Chem. 176:2603 (1975)

Bailey, K., Bettelheim, F.R., Lornad, L., Middlebrook, W.R.:

Action of thrombin in the clotting of fibrinogen.

Nature 167:233 (1951)

Beller, F.K.:

Fibrinogenopathia intra partum.

Blut 9:65 (1963)

Beller, F.K., Graeff, H., Gorstein, F.:

Disseminated intravascular coagulation during the continuous infusion of endotoxin in rabbits.

Morphological and physiological studies.

Amer. J. Obstet. Gynec. 103:544 (1969)

Benabid, Y., Concord, E., Suscillon, M.:

Soluble fibrin complexes: Separation as a function of pH and characterization.

Thrombos. Haemostas. 37:144 (1977)

Bettelheim, F.R., Bailey, K.:

The products of the action of thrombin on fibrinogen.

Biochim. biophys. Acta 9:578 (1952)

Blättler, W., Straub, P.W., Peyer, A.:

Effect of in vivo produced fibrinogen-fibrin intermediates on viscosity of human blood.

Thrombos. Res. 4:787 (1974)

Bleyl, U., Kuhn, W., Graeff, H.:

Reticulo-endotheliale Clearance intravasaler Fibrinmonomere in der Milz.

Thrombos. Diathes. haemorrh. 22:87 (1969)

Blombaäck, B., Blombäck, M.:

Purification of human and bovine fibrinogen.

Ark. Kemi 10:415 (1956)

Blombäck, B., Yamyshina, I.:
On the N-terminal amino acids in fibrinogen and fibrin.
Ark. Kemi 12:299 (1958)

Blombäck, P., Blombäck, M., Edmann, P., Hessel, P.:
Human fibrinopeptides: Isolation, characterisation and
structure.
Biochim. biophys. Acta 115:371 (1966)

Blombäck, B.:
Fibrinogen to fibrin transformation.
In: Blood clotting enzymology. W.H.Seegers (Hrsg.)
Academic Press, New York (1967)

Blombäck, B., Blombäck, M.:
The molecular structure of fibrinogen.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 202:77 (1977)

Brass, E.P., Forman, W.B., Edwards, R.V., Lindan, O.:
Fibrin formation: The role of the fibrinogen-fibrin monomer
complex.
Thrombos. Haemostas. 36:37 (1976)

Brosstad, F., Godal, H.C., Kierulf, P.:
Some characteristics of various fibrin monomer preparations
made from dissolved fibrin clots.
Haemostasis 6:213 (1977)

Brosstad, F.:
Different chromatographic behaviour of soluble, non FSF-
stabilized des-AA-fibrin-fibrinogen and des-AABB-fibrin-
fibrinogen complexes.
Thrombos. Res. 15:563 (1979)

Cummine, H., Lyons, R.N.:
A study in intravascular thrombosis with some new conceptions
of the mechanism of coagulation.
Brit. J. Surg. 35:337 (1948)

De Prez, R.M., Marney, S.R.:
Immunological reactions involving platelets.
In: The circulating platelet. S.A.Johnson (Hrsg.)
Academic Press, New York (1971)

Ebert, C., Beller, F.K.:
High molecular weight fibrin derivatives in pre-eclampsia.
In: Haemostasis and thrombosis. G.G.Neri Serneri, C.R.M.
Prentice (Hrsg.) Academic Press, New York (1979)

Edman, P., Sjöquist, J.:
Identification and semi-quantitative determination of phenyl
thioloyd-anions.
Acta Chem. Scand. 10:1507 (1956)

Endres, G.F., Scheraga, H.A.:
Equilibria in the fibrinogen-fibrin conversion. IX Effects
of calcium ions on the reversible polymerization of fibrin
monomer.

Arch. Biochem. Biophys. 153:266 (1972)

Mc Farlane, A.S.:

Efficient trace labeling of proteins with iodine.
Nature 182:53 (1958)

Fletcher, A.P., Alkjaersig, N.K.:

Gel chromatography of fibrinogen in the diagnosis of
prethrombotic states.

In: Haemostasis and thrombosis. G.G. Neri Serneri, C.R.M.
Prentice (Hrsg.), Academic Press, New York (1979)

Gerrits, W.B.J., Flier, O.T.N., van der Meer, J.:

Fibrinopeptid A immunoreactivity in human plasma.
Thrombos. Res. 5:197 (1974)

Godal, H.C., Abildgaard, U.:

Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol.
Scand. J. Haemat. 3:342 (1966)

Godal, H.C., Abildgaard, U., Kierulf, P.:

The ethanol test - an indicator of fibrinemia.
Coagulation 3:343 (1971)

Graeff, H., Von Hugo, R.:

Identification of fibrinogen derivatives in plasma samples.
Thrombos. Diathes. haemorrh. 27:610 (1972)

Graeff, H., von Hugo, R., Hafter, R.:

In vivo formation of soluble fibrin monomer complexes in
human plasma.
Thrombos. Res. 3:465 (1973a)

Graeff, H., von Hugo, R., Kuhn, W., Scholz, H., Ernst, A.,
Gastroph, R.:

Fibrinogen derivatives with a higher molecular weight than
that of the parent molecule in cord vein plasma of newborns.
I. Identification in single plasma samples.
Klin. Wschr. 51:695 (1973b)

Graeff, H., von Hugo, R.:

Fibrinogen derivatives in a case of abruptio placentae.
Am. J. Obstet. Gynecol. 120:335 (1974)

Graeff, H., Wiedemann, A., von Hugo, R., Hafter, R.:

Amount and distribution pattern of soluble fibrin monomer
complexes during the early puerperium.
Am. J. Obstet. Gynecol. 124:21 (1976a)

Graeff, H., Ernst, E., Bocaz, J.A., von Hugo, R., Hafter, R.:
Evaluation of hypercoagulability in septic abortion.
Haemostasis 5:285 (1976b)

Graeff, H., von Hugo, R., Hafter, R.:
Evaluation of hypercoagulability and intravascular coagulation by estimation and characterization of soluble fibrin monomer complexes (SFMcs).
In: Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis, Vol.3,
J.F. Davidson, R.M. Rowan, M.M. Samama, P.C. Desnoyers (Hrsg.)
Raven Press, New York (1978)

Graeff, H., Hafter, R., Bachmann, L.:
Subunit and macromolecular structure of circulating fibrin from obstetric patients with intravascular coagulation.
Thrombos. Res. 16:313 (1979)

Graeff, H., Kuhn, W.:
Coagulation disorders in obstetrics.
Thieme, Stuttgart, (1980)

Gurewich, V., Grinspoon, L.:
Blood coagulation in pregnancy: Proconvertin and prothrombin and the hypercoagulability states.
New Engl. J. Med. 154:358 (1956)

Hafter, R., Schneeberger, T., Tafel, K., Ernst, E., Graeff, H.:
Bestimmung von löslichen Fibrinmonomerkomplexen zur Erfassung der Hyperkoagulabilität in der Schwangerschaft und unter der Geburt.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 35:518 (1975)

Hafter, R., Graeff, H.:
Estimation of soluble fibrin monomer complexes by agarose gel filtration.
In: Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis, Vol 2, J.F. Davidson, M.M. Samama, P.C. Desnoyers (Hrsg.), Raven Press, New York (1976)

Hafter, R., Tafel, K., Bocaz, J.A., Jilg, W., Graeff, H.:
Über den Nachweis der Hyperkoagulabilität bei Patientinnen mit gynäkologischen Karzinomen und die Charakterisierung einiger in diesem Zusammenhang auftretender Fibrinogenfraktionen.
In: Onkohämostasiologie. H.Gastpar (Hrsg.)
E.K. Schattauer, Stuttgart (1976)

Hafter, R.:
Verhalten löslicher Fibrinmonomerkomplexe während der Agarose- Gelfiltration bei verschiedenen Temperaturen.
Vortrag auf der Tagung der deutschen Gesellschaft für Blutgerinnungsforschung in Essen, (1977), im Druck

Hafter, R., Müller-Berghaus, G., von Hugo, R., Graeff, H.:
Estimation and characterisation of soluble fibrin monomer
complexes during endotoxin induced intravascular coagulation.
Thrombos. Res. 10:711 (1977)

Harder, A.J., Straub, P.W.:
In vitro and in vivo induction of cryofibrinogen and "para-
coagulation" by Reptilase.
Thrombos. Diathes. haemorrh. 2:337 (1972)

Heene, D.L.:
Methodik zur Feststellung der disseminierten intravaskulären
Gerinnung.
In: Generalisierte intravaskuläre Gerinnung - Beeinflussung
der Hämostase durch gefäßaktive Pharmaka. Roka, L. (Hrsg)
Schattauer, Stuttgart (1971)

Heene, D.L.:
Blood coagulation mechanism and endotoxins: Haemostatic
defect in septic shock.
In: Infections and mode of endotoxin actions - pathophysio-
logical, immunological and clinical aspects. B.Urbaschek,
R.Urbaschek, E.Neter (Hrsg.)
Springer, Wien, New York (1973)

Heene, D.L., Matthias, F.R.:
Adsorption of fibrinogen derivatives on insolubilized
fibrinogen and fibrinmonomer.
Thrombos. Res. 2:137 (1973)

von Hugo, R., Graeff, H.:
Fibrinogen derivatives with a higher molecular weight than
that of the parent molecule in cord vein plasma of newborns.
II. Further characterization from pooled plasma.
Klin. Wschr. 51:699 (1973a)

von Hugo, R., Graeff, H.:
Identifizierung und Präparation von hochmolekularen Derivaten
des Fibrinogens aus Humanplasma durch PAA-Gelelektrophorese
und Agarose-Gelchromatographie.
In: Leber und Blutstillung. Antikoagulantien - Aggregations-
hemmer. H.Egli und H.Beaser (Hrsg.)
F.K. Schattauer, Stuttgart (1973b)

von Hugo, R., Graeff, H., Müller-Berghaus, G.:
High molecular weight derivatives of fibrinogen and their
relation to the total fibrinogen content following the in-
fusion of endotoxin in pregnant rabbits.
In: Gram-negative bacterial infections. B.Urbaschek, R.
Urbaschek, E.Neter (Hrsg.)
Springer, New York (1975a)

von Hugo, R., Hafter, R., Stemberger, A., Graeff, H.:
Soluble fibrin monomer complexes demonstrated by agarose
gel filtration and by adsorption on insolubilized fibrin-
ogen. A comparative study.
Thrombos. Diathes. haemorrh. 34:216 (1975b)

von Hugo, R., Hafter, R., Stein, B., Stemberger, A., Rjosk,
H., Graeff, H.:
Incorporation of 125 J-Fibrinogen in circulating soluble
fibrin monomer complexes during hypercoagulability.
Thrombos. Res. 10:703 (1977a)

von Hugo, R., Hafter, R., Stemberger, A., Graeff, H.:
Complex formation of crosslinked fibrin oligomers with
agarose-coupled fibrinogen and fibrin.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 358:1359 (1977b)

von Hugo, H., Dreiser, M., Hafter, R., Graeff, H.:
Postoperative Thromboembolieprophylaxe in der Gynäkologie.
In: Klinische und ambulante Anwendung klassischer Anti-
koagulationen. R.Marx, H.A.thies (Hrsg.)
F.K. Schattauer, Stuttgart (1977c)

von Hugo, R., Hiller, K.F., Hafter, R., Lochmüller, H.,
Graeff, H.:
Hypercoagulability and thrombosis in patients with gynecological cancer under radiotherapy.
Thrombos. Haemostas. 42:275 (1979a)

von Hugo, R., Seidl, E., Fleischmann, B., Graeff, H.:
In vivo behaviour of urea soluble 125 J-fibrin monomers.
In: Haemostasis and thrombosis: G.G.Neri Serneri, C.R.M.
Prentice (Hrsg.)
Academic Press, New York (1979b)

von Hugo, R.:
Lösliches Fibrin - in vitro und in vivo Untersuchungen.

Habilitation
München, (1980)

Jacobsen, E., Ly, B., Kierulf, P.:
Incorporation of fibrinogen into soluble fibrin complexes.
Thrombos. Res. 4:499 (1974)

Mc Kay, D.G., Shapiro, S.S.:
Alterations in the blood coagulation system induced by
bacterial endotoxin. I. In vivo (generalized Shwartzman
reaction).
J. exp. Med. 107:353 (1958)

Kierulf, P.:

Studies on soluble fibrin in plasma.IV: Isolation and characterization of the clottable proteins obtained from thrombin incubated plasma upon gelation with ethanol. Thrombos. Res. 3:613 (1973)

Korst, D.R., Kratochvil, C.H.:

Cryofibrinogen in a case of lung neoplasma associated with thrombophlebitis migrans. Blood 10:945 (1955)

Krell, W., Mahn, I., Müller-Berghaus, G.:

Gel filtration of 125 J-fibrin and 131 J-fibrinogen at 20 °C and 37 °C. Thrombos. Res. 15:299 (1979)

Kudryk, B., Collen, D., Woods, K.R., Blombäck, B.:

Evidence for localization of polymerization sites in fibrinogen. J. biol. Chem. 149:3322 (1974)

Kuhn, W., Bröcker, G., Graeff, H., Bleyl, U., Frost, H.:

Nachweis von Fibrinmonomeren im Nabelvenenblut. Klin. Wschr. 49:106 (1971)

Kuhn, W., Graeff, H., von Hugo, R., Baumgärtner, M.,

Köller, R., Marx, R.:

Nachweis von löslichen Fibrinmonomerkomplexen im Plasma von Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren. In: Strahlen, Blutgerinnung und Hämostase. XVI. Hamburger Symposium über Blutgerinnung, 1.-2.Juni 1973. R.Marx, H.A. Thies (Hrsg.)

Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl., S.195 (1974)

Kuhn, W., Graeff, H.:

Gerinnungsstörungen in der Geburtshilfe. Thieme, Stuttgart (1977)

Kwaan, H.C., Barlow, G.H.:

The mechanism of action of Arvin and Reptilase. Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 47:361 (1971)

Laki, K., Mommaerts, W.F.H.:

Transition of fibrinogen to fibrin as a two step reaction. Nature 156:664 (1954)

Latallo, Z.S.:

Degradation of fibrinogen.

In: Struktur und Funktion des Fibrinogens in Blutgerinnung und Mikrozirkulation. XVII.Tagung der dt. Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung 1973.

H.Schröder, G.Hauck, E.Zimmermann (Hrsg.)

F.K.Schattauer, Stuttgart, S.45 (1976)

Lipinski, B., Hawiger, J., Jelienszewicz, J.:
Staphylococcal clumping with soluble fibrin monomer complexes.
J. exp. Med. 126:979 (1967)

Ly, B., Kierulf, P., Jacobsen, E.:
Stabilization of soluble fibrin/fibrinogen complexes by
fibrin stabilizing factor (FSF).
Thrombos. Res. 4:509 (1974)

Lyons, R.N.:
Thiol-vitamine K mechanism in the clotting of fibrinogen.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 23:131 (1945)

Mahn, I., Krell, W., Müller-Berghaus, G.:
Separation of human Des-AB fibrin and fibrinogen by sepha-
rose-plasma-chromatographie at 20 °C and 37 °C.
Thrombos. Res. 14:651 (1979)

Müller-Berghaus, G.:
Pathophysiologie der manifesten generalisierten intravas-
kulären Gerinnung.
In: Generalisierte intravaskuläre Gerinnung - Beeinflussung
der Hämostase durch gefäßaktive Pharmaka. XIII. Tagung der
dt. Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung 1969.
L. Roka (Hrsg.) F.K. Schattauer, Stuttgart (1971)

Müller-Berghaus, G., Lasch, H.G.:
Microcirculatory disturbances induced by generalized intra-
vascular coagulation.
In: Handbook of experimental pharmacology. Vol. XVI/3
G.V R. Born, O. Eichler, A. Herken, A.D. Welch (Hrsg.)
Springer, Berlin (1975)

Müller-Berghaus, G., Mahn, I., Köveker, G., Maul, F.D.:
In vivo behaviour of hamologous urea-soluble 131 J-fibrin
and 125 J-fibrinogen in rabbits: The effect of fibrinolysis
inhibition.
Brit. J. Haematol. 33:61 (1976)

Müller-Berghaus, G., Moeller, R.M., Mahn, I.:
Fibrinogen turnover in pregnant rabbits during the first and
last thirds of gestation.
Am. J. Obstet. Gynec. 131:655 (1978)

Niewiarowski, S., Gurewich, V.:
Laboratory identification of intravascular coagulation.
J. Lab. clin. Med. 77:665 (1971)

Nossel, H.L., Yudelmann, I., Canfield, R.E., Butler, V.P.,
Spanodis, K., Wilner, G.D., Qureshi, G.D.:
Measurement of fibrinopeptide A in human blood.
J. clin. Invest. 54:43 (1974)

Pizzo, S.V., Taylor, L.M., Schwartz, M.L., Hill, R.L.,
Mc Kee, P.A.:
Subunit structure of fragment D from fibrinogen and cross-
linked fibrin.
J. biol. Chem. 148:4584 (1973)

Sachs, L.:
Angewandte Statistik.
Springer, Berlin, Heidelberg (1974)

Sasaki, T., Page, J.H., Shainoff, J.R.:
Stable complex of fibrinogen and fibrin.
Science 153:1069 (1966)

Shainoff, J.R., Page, J.H.:
Cofibrins and fibrin-intermediates as indicators of thrombin
activity in vivo.
Circulat. Res. 8:1013 (1960)

Shainoff, J.R., Page, J.H.:
Significance of cryprofibrin in fibrinogen-fibrin conver-
sion.
J. exp. Med. 116:687 (1962)

Shainoff, J.R., Dardik, N.:
Role of fibrinogen in fibrin transport: Chromatographic
studies.
Thrombos. Res. 17:491 (1980)

Sherman, L.A.:
Fibrinogen turnover: Demonstration of multiple pathways
of catabolism.
J. Lab. clin. Med. 79:710 (1972)

Shulman, S., Ferry, J.D.:
The conversion of fibrinogen to fibrin. II. Influence of
pH and ionic strength on clotting time and clot opacity.
J. Physiol. Coll. Chem. 54:66 (1950)

Smith, G.F., Bang, N.U.:
Formation of soluble fibrin polymers. Fibrin degradation
fragments D and E fail to form soluble complexes with
fibrin monomer.
Biochemistry 11:2958 (1972)

Stemberger, A., Hörmann, H.:
Affinity chromatography on immobilized fibrinogen and fibrin
monomer. The behaviour of cold-insoluble globulin.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357:1003 (1976)

Straughn, W., Wagner, R.H.:
A simple method for preparing fibrinogen.
Thrombos. Diathes. haemorrh. 16:198 (1966)

Thomas, L., Smith, R.T., von Korff, R.:
Cold precipitation by heparin of a protein in rabbit
and human plasma.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86:813 (1954)

Vermynen, J., Donati, M.B., Verstraete, M.:
The identification of fibrinogen derivatives in plasma
and serum by agarose gel filtration.

In: Fibrinogen degradation Products.

M.Verstraete, J.Vermynen, M.B.Donati (Hrsg.)

Scand. J. Haematol. Suppl. 13:219 (1971)

Weber, K., Osborne, M.:

The reliability of molecular weight determinations by
dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Biol. Chem. 244:4406 (1969)

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. H. Graeff für die freundliche Überlassung des Themas und das stets rege Interesse an dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. J. Zander für die Arbeitsmöglichkeit an seiner Klinik.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. med. R. von Hugo verpflichtet. Er war mir sowohl während des Versuchs als auch bei der Auswertung der Ergebnisse durch sein großes Engagement, die vielen fördernden Diskussionen und die stete Hilfsbereitschaft ein vorbildlicher Betreuer.

Auch Herrn Dr. rer. nat. R. Hafter sei Dank für seine freundliche Beratung bei biochemischen Fragen.



Lebenslauf

Am 5. 11. 1953 wurde ich als zweites Kind des Psychologen Prof. Dr. phil. Rudolf Stein und der Psychologin Dr. Anna Ruth Stein in Bremen geboren.

Ich habe eine Schwester und einen Bruder.

Nach 4jährigem Besuch der Grundschule besuchte ich 8 Jahre lang das Gymnasium Am Barkhof in Bremen und bestand dort 1972 das Abitur auf dem mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig.

Von 1972 bis 1973 arbeitete ich als Krankenpflegehelferin im Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße in Bremen.

Im Sommersemester 1973 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig Maximilians-Universität in München und bestand dort am 14.12.1979 den Dritten Teil der Ärztlichen Prüfung.

